金龟子绿僵菌及其粗毒素对樟巢螟幼虫的致病性

童应华，李万里，马淑娟

（福建农林大学林学院，福州 350002）

摘要：【目的】为了筛选感染樟巢螟 *Orthaga achatina* 幼虫的高致病力金龟子绿僵菌 *Metarhizium anisopliae* 菌株，并研究绿僵菌粗毒素对幼虫的毒力和取食粗毒素后幼虫的血淋巴细胞免疫反应。【方法】以死亡率-时间几率值法和 TDM 模型分析绿僵菌及其粗毒素对樟巢螟幼虫的致病力，并显微观察处理幼虫的血淋巴细胞的变化。【结果】绿僵菌菌株 Ma1291-2 对樟巢螟幼虫有较强的致病力，以浓度 $(1.0\pm0.5)\times10^8$ 个孢子/mL 的孢子悬液接菌 11 d 后，幼虫的校正死亡率和僵虫率分别为 99.8%±2.6% 和 86.9%±1.3%，LT_{50} 为 6.29 d。各菌株产粗毒素水平与其对幼虫的校正死亡率和 LT_{50} 呈显著相关。通过时间-剂量-死亡率模型参数估算，Ma1291-2 菌株及其粗毒素对幼虫致死效应较强的时间段分别为接菌后 6－7 d 和 3－4.5 d。幼虫取食绿僵菌粗毒素后 2 d，总血细胞、浆血细胞、珠血细胞和类绛血细胞浓度上升到最高值，而后下降；粒血细胞浓度 2 d 后开始极显著上升，第 3 天达到最高值后急速下降；原血细胞前 3 d 未发现有明显的数量变化，第 4 天显著下降。幼虫取食粗毒素 3～4 d 后，浆血细胞和粒血细胞有破裂，珠血细胞和类绛血细胞有黑化现象，原血细胞病态变化不明显。【结论】樟巢螟幼虫取食绿僵菌粗毒素后 2－3 d，幼虫血淋巴细胞对粗毒素的免疫反应最强烈，且粗毒素对血细胞有毒害和破坏作用。本研究为该害虫的生物防治提供了一定的理论与应用基础。

关键词：金龟子绿僵菌；粗毒素；樟巢螟；致病性；血细胞；免疫反应

中图分类号：Q965.8　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296(2014)04-0418-10

Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* and its crude toxin against *Orthaga achatina* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae

TONG Ying-Hua, LI Wan-Li, MA Shu-Juan (College of Forestry, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: 【Aim】The study aimed to screen a highly pathogenic *Metarhizium anisopliae* strain against *Orthaga achatina* larvae, to determine its virulence by feeding larvae with crude toxin and to assess the lymphocyte responses in the larvae. 【Methods】The virulence of *M. anisopliae* strains and crude toxin to *O. achatina* larvae was assessed using mortality-time probability method and TDM model, respectively, and the changes of lymphocytes in treated larvae were observed through a microscope. 【Results】When various strains are compared, Ma1291-2 strain exhibited the strongest virulence against *O. achatina* larvae, causing a corrected mortality of 99.8%±2.6%, the cadaver rate of 86.9%±1.3% and the half lethal time (LT_{50}) of 6.29 d after inoculation with $(1.0\pm0.5)\times10^8$ spores/mL for 11 d. The crude toxin levels produced by different strains were significantly correlated with the corrected mortality and LT_{50}. A time-dose-mortality model was employed to estimate parameters of time and dose, showing that Ma1291-2 strain and its crude toxin had a strong lethal effect on *O. achatina* larvae during 6－7 and 3－4.5 d after treatment, respectively. The concentrations of total hemocytes, plasmatocytes, spherulocytes and oenocytoids reached the maximum at 2 d after the larvae were fed with the crude toxin of Ma1291-2 strain and then declined. The concentration of granulocytes rapidly increased at 2 d after the larvae were fed with the crude toxin of Ma1291-2 strain, and reached a peak at 3 d after treatment. However, the concentration of prohemocytes did not show any significant change during the first three days of treatment, but decreased significantly at 4 d after treatment. Rupture of plasmatocytes and granulocytes, and melanization of spherulocytes and oenocytoids were observed during 3－4 d after treatment with the crude toxin of Ma1291-2, but prohemocytes did not significantly change. 【Conclusion】The results show that the immune response of larval lymphocytes to the crude toxin is the strongest during 2－3 d after

基金项目：福建省自然科学基金项目(2012D083)；福建省林业厅林业科研专项计划项目[闽林科(2010)4 号]

作者简介：童应华，男，1971 年生，福建清流人，博士，副教授，研究方向为森林昆虫学与虫生真菌研究，E-mail: fjtongyh@163.com

收稿日期 Received: 2014-01-06；接受日期 Accepted: 2014-03-31

treatment, and the crude toxin is toxic to lymphocytes. This study proves potential applicability of this pathogen in the development of biological control for *O. achatina*.

Key words: *Metarhizium anisopliae*; crude toxin; *Orthaga achatina*; pathogenicity; hemocyte; immune response

绿僵菌属是研究和应用较广的虫生真菌,能寄生 8 个目 42 个科的 200 多种昆虫,以及螨类和线虫等(王记祥和马良进,2009;Su *et al.*, 2013)。绿僵菌素是绿僵菌分泌的次生代谢物质,有助于病原真菌侵染寄主,加快病程(Claydon and Grove, 1982),其在绿僵菌对寄主的侵染并致死过程中起关键作用(蒲蛰龙等,1996)。Kershaw 等(1999)研究证实了虫体内真菌毒素的产量与其被感染致死中时(LT_{50})及死亡率显著相关。

绿僵菌素种类繁多,功能各异,目前已经发现 35 种绿僵菌素,其中 28 种来自绿僵菌(胡琼波和任顺祥,2004),主要包括蛋白酶、几丁质酶、酯酶、脂酶、淀粉酶等酶类高分子蛋白毒素和环缩肽类、色素类、有机酸类等低分子毒素,以及一些非酶类糖蛋白等大分子毒素。绿僵菌粗毒素是发酵后的菌丝粗提物,生产工艺相对简单,有较好的应用前景,研究其对害虫的致病性和致病机理,是应用绿僵菌进行害虫生物防治的新途径。Gillespie 和 Claydon(1989)及胡琼波等(2007)认为,除了破坏素 E 有直接的接触毒性外,其他的通过血腔注射或吞食后才能表现出杀虫活性,Brousseau 等(1996)也提出绿僵菌素对昆虫有胃毒作用。因此,作者应用浸叶喂食的方法,研究绿僵菌粗毒素对幼虫的致病性。

有关绿僵菌粗毒素对昆虫致病性及其应用的研究报道甚少。绿僵菌粗毒素浸渍幼虫对小菜蛾、斜纹夜蛾有较强的毒力,并与真菌爪哇棒孢霉 *Isaria javanicus*、爪哇拟青霉 *Paecilomyces javanicus* Pj-01 混配组合都有显著的增效作用(尹飞等,2010)。应用绿僵菌及其粗毒素对樟巢螟的致病性等相关研究尚未见报道。樟巢螟 *Orthaga achatina* 属鳞翅目螟蛾科,是一种危害樟科植物的主要食叶害虫,该虫主要以幼虫食叶和吐丝缀叶形成鸟巢状虫苞危害樟科植物,影响寄主植物的正常生长和景观效果;该虫分布广泛,国内分布于湖北、江西、浙江、江苏、广西、上海和福建等省市(自治区),国外主要分布于日本、印度、朝鲜及马来西亚等国家(吴雪芬等,2006)。本研究筛选感染樟巢螟幼虫的高致病力绿僵菌菌株,并用喂食法研究绿僵菌粗毒素对幼虫的毒力,以及幼虫取食粗毒素后血淋巴细胞的免疫反应,旨为该害虫的生物防治提供菌株资源和理论依据。

1　材料与方法

1.1　供试昆虫

2013 年 7 月下旬至 8 月上旬,于福建省永安市永安林业集团香樟种苗基地(燕江站吉峰工区 29 林班 2 大班 1 和 10 小班,燕江站铜盘工区 13 林班 12 大班 4 小班,以及合群村芳香樟种苗基地)林间采回供试樟巢螟幼虫。将采回的幼虫放入塑料盒(24 cm × 20 cm),以鲜嫩香樟树叶室内饲养。

1.2　供试菌株

供试绿僵菌菌株系福建省林业科学研究院森林保护研究所何学友教授级高工提供,基本情况如表 1。

表 1　供试绿僵菌菌株来源

Table 1　The origin of tested *Metarhizium anisopliae* strains

菌株编号 Strains no.	采集地 Collecting location	来源 Origin	初始分离时间 Initial isolation time
MaYDTR-008	福建永定 Yongding, Fujian	土壤 Soil	2005.8
Ma1291-2	台湾台北阳明山 Yangming Mountain, Taibei, Taiwan	松墨天牛幼虫 *Monochamus alternatus* larvae	1996.12
MaYT-04	福建永定 Yongding, Fujian	土壤 Soil	2005.8
Ma1775	日本茨城县筑波市 Tsukuba, Ibaraki, Japan	松墨天牛幼虫 *M. alternatus* larvae	2002.5
Ma23-2	福建武平 Wuping, Fujian	土壤 Soil	2006.9

1.3　主要仪器和试剂

OLYMPUS CX31 显微镜(日本奥林巴斯光学工业株式会社);SHB-III 循环水多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司);RE52CS 旋转蒸发器(上海亚

荣生化仪器厂）；ZRD-A7140全自动新型鼓风干燥箱（上海智城分析仪器制造有限公司）；二氯甲烷、乙酸乙酯、甲醇、甘油、磷酸二氢钠、磷酸二氢钾等均为国产分析纯。

1.4 绿僵菌对樟巢螟幼虫的致病力测定

1.4.1 高致病力菌株筛选：为准确控制单头虫体接菌量，采取点滴法接菌。选择饲养了3 d的2－3龄健康幼虫，用移液枪吸取浓度$(1.0\pm0.5)\times10^8$个孢子/mL的孢子悬液，滴于幼虫体表（稍作拖涂），接菌量为每头10 μL，接菌后，放入培养皿（d＝11 cm），加入鲜嫩芳香樟叶片，浸无菌水的脱脂棉保湿，于25±1℃，RH 90%±1%的人工气候箱中饲养（10L∶14D），3 d更换1次叶片。每天定时观察、记录各处理幼虫的死亡情况，并及时将死虫转入无菌培养皿中，置于25±1℃的恒温培养箱中保湿培养，观察死虫表面菌丝生长和产孢情况。连续观察至其中一株菌株处理的幼虫全部死亡为止。统计各处理幼虫死亡数和僵虫数。每菌株为一处理，每处理设5个重复，每重复接菌20～25头幼虫。以滴等量的0.01%吐温-80无菌水处理作对照。

1.4.2 高致病力菌株对幼虫的致病力：选择致病力较强的菌株，分别以5.5×10^8，1.5×10^7，1.0×10^6，1.5×10^5和1.5×10^4个孢子/mL 5个浓度梯度的孢子悬液接菌，接菌、饲养和观察方法同1.4.1节。每处理测定30头2～3龄健康幼虫，以0.01%吐温-80无菌水处理为对照。

1.5 绿僵菌粗毒素对樟巢螟幼虫的致病力测定

1.5.1 液体发酵：液体种子培养：以液体种子培养基（去皮土豆200 g煮30 min滤液，葡萄糖20 g，蛋白胨20 g，蒸馏水定容至1 000 mL）配置成浓度1.0×10^7个孢子/mL的孢悬液，于28℃、180 r/min振荡培养3 d。发酵培养：将培养好的种子液按1∶9（v/v）接入发酵液培养基（含麦芽糖25.5 g，蛋白胨7.5 g，葡萄糖7.5 g，β-丙氨酸0.2 g，调整pH值至8.0，蒸馏水定容至1 000 mL），500 mL锥形瓶中装30 mL种子液＋270 mL发酵培养基，置于28℃、220 r/min下振荡发酵。8 d后，将发酵液用3层滤纸真空抽滤获得过滤液，－4℃冷藏备用。菌丝70℃，烘干30 min称重，每一菌株称重5个重复。

1.5.2 粗毒素提取：粗毒素的提取采用胡琼玻等(2007)的方法，将滤液调整pH至4.0，用等体积的乙酸乙酯和二氯甲烷混合物(1∶1，v/v)萃取3次，收集有机相并在旋转蒸发器上70℃浓缩得到粗毒素。

1.5.3 高致病力菌株粗毒素对幼虫的致病力测定：用蒸馏水将高致病力菌株的粗毒素，配制成2 000，1 000，500，250和100 mg/L 5种浓度梯度的溶液。将芳香樟嫩枝（留2～3片叶）用无菌水洗净、晾干，以浸叶法用镊子夹取嫩枝于粗毒素溶液中浸泡约1 min后，沥干（不滴液体为止）放入玻璃瓶中，将饥饿12 h后的2－3龄幼虫放入，每瓶放5头幼虫，以浸无菌水的脱脂棉保湿，铁纱罩住，置于25±1℃，RH 90%±1%的人工气候箱中饲养，每12 h观察1次幼虫死亡情况，以触其不动或侧翻者视为死亡，连续观察至其中一个浓度处理的幼虫全部死亡为止。以蒸馏水中浸泡等时间的嫩叶喂食幼虫处理作对照。每种浓度为一处理，每处理30头幼虫。

1.6 樟巢螟幼虫血淋巴细胞对绿僵菌粗毒素的免疫反应测定

1.6.1 总血淋巴细胞浓度测定：按1.5.3节方法，应用高致病力菌株粗毒素，以浓度2 000 mg/L的粗毒素溶液浸叶饲养幼虫，分别于未处理前（0 d），喂食粗毒素后1，2，3，4，5和6 d，随机抽取5头幼虫，用微量注射器刺破幼虫腹部，吸取2 μL血淋巴，用生理盐水稀释1 000倍，混匀后，血球计数板计数，1头幼虫为1个重复。以蒸馏水中浸泡等时间的嫩叶喂食幼虫处理作对照。

1.6.2 粗毒素对幼虫各类血细胞浓度和形态的影响：在1.6.1节取血淋巴的同时，取血淋巴液均匀涂布载玻片上，自然风干后，用瑞姬氏（Wright-Giemsa）染色法染色（傅贻玲，1982；王九辉，2007；王强等，2011）。染色后在OLYMPUS CX31显微镜下观察与计数各类型血细胞，并在×100倍镜下，应用Image-Pro Plus 6.0软件进行拍照和测量血细胞的大小。根据各种血细胞形态和染色效果，将血细胞分为浆血细胞（plasmatocyte）、粒血细胞（granulocyte）、类绛血细胞（oenocytoid）、珠血细胞（spherulocyte）和原血细胞（prohemocyte）（傅贻玲，1982；田俊策和叶恭银，2006；王世贵等，2006；王九辉，2007），对数量极少或未知的归为其他血细胞。每头虫为1个重复，每重复分类计数共100个以上的血细胞，得出各类型血细胞比例，再根据其总血细胞浓度，折算成每重复各类型血细胞浓度（程惊秋，1987；王九辉，2007）。

1.7 数据处理与分析

数据应用Excel 2007处理后，采用DPS数据处理系统（7.55）进行方差分析和Duncan氏新复极差法多重比较。致病力回归方程和致死中时（LT_{50}）采用死亡率-时间几率值分析法，即以时间（d）的对数

值为 X,将死亡率转换的几率值为 Y(唐启义和冯明光,2002)。并用时间-剂量-死亡率模型(TDM 模型)进行模拟分析菌株及其粗毒素的致病力(唐启义和冯明光,2002;徐华潮等,2006;何学友,2007;童应华,2012;Qiu *et al.*, 2013)。相关计算公式如下:

$$死亡率(\%) = \frac{死亡虫数}{供试虫数} \times 100 \quad (1)$$

$$校正死亡率(\%) = \frac{处理死亡率(\%) - 对照死亡率(\%)}{100 - 对照死亡率(\%)} \times 100 \quad (2)$$

$$僵虫率(\%) = \frac{僵虫数}{供试虫数} \times 100 \quad (3)$$

TMD 模型的表述如下:

由于累计死亡概率是时间连续的变量,不满足模型模拟的独立性假设,生物学意义不大,而条件死亡概率的计算依赖于完全相互独立的时间区间,它是区间结束时的实际死亡数与区间起始时的存活数之比,满足时间变量的独立性假设。因此,本文仅考虑不同剂量使试虫在时间区间$[t_{i-1}, t_i]$($i=1, 2, \cdots, i$)内可能发生的条件死亡概率:

$$q_{ij} = 1 - \exp[-\exp(r_i + \beta \log10(d_j))] \quad (4)$$

式中 q_{ij}表示在时间区间$[t_{i-1}, t_i]$内由剂量 d_j($j=1, 2, \cdots, j$)引起的可能发生的条件死亡概率,待估参数 β 表示条件死亡率模型的剂量效应参数(即与剂量效应有关的斜率),γ_i 表示条件死亡率模型时间区间$[t_{i-1}, t_i]$内的时间效应参数估计值(冯明光,1998;吕利华等,2007)。

2 结果与分析

2.1 绿僵菌对樟巢螟幼虫的致病力

5 株菌株中,Ma1291-2 菌株处理后 12 d 幼虫已全部死亡,统计前 11 d 幼虫的致死情况见表 2,各菌株对幼虫的致病力差异较大,其中,以 Ma1291-2 对樟巢螟的致病力最强,校正死亡率和僵虫率极显著高于其他菌株,LT_{50}最短,为 6.29 d。

表 2　不同绿僵菌菌株处理 11 d 时对樟巢螟幼虫的致死效果

Table 2　Lethal effects of different *Metarhizium anisopliae* strains on *Orthaga achatina* larvae at 11 d after treatment

菌株 Strains	死亡率(%) Mortality	累计校正死亡率(%) Cumulative corrected mortality	僵虫率(%) Cadaver rate	回归方程 Regression equation	致死中时(d) LT_{50}	相关系数 R Correlation coefficient
Ma1291-2	99.82	99.80 ± 2.58 aA	86.91 ± 1.29 aA	$y = -0.3258 + 0.1312x$	6.29	0.9753
Ma1775	79.97	77.22 ± 1.89 bB	71.39 ± 0.93 bB	$y = -0.2975 + 0.1022x$	7.80	0.9745
Ma23-2	72.48	68.42 ± 1.08 cB	67.68 ± 0.61 bB	$y = -0.2672 + 0.0913x$	8.41	0.9737
MaYDTR-008	60.00	54.05 ± 1.48 dC	49.98 ± 1.57 cC	$y = -0.2129 + 0.0709x$	10.05	0.9770
MaYT-04	51.48	44.20 ± 1.62 eC	38.60 ± 2.21 dD	$y = -0.1622 + 0.0575x$	11.50	0.9800
无菌水(CK) Sterile water	13.00	–	–	–	–	–

接菌浓度为$(1.0 \pm 0.5) \times 10^8$ 孢子/mL,接菌量为每头 10 μL。表中数据为平均值 ± *SE*;同列数据后不同大小写字母分别表示 Duncan 氏新复极差显著性检验 $P<0.01$ 和 $P<0.05$ 水平。Inoculation concentration per larva is 10 μL with $(1.0 \pm 0.5) \times 10^8$ spores/mL. The data are means ± *SE*. Different capital and small letters following the data in the same column mean significant difference by Duncan's new multiple range method tested at $P<0.01$ and $P<0.05$ levels, respectively.

2.2 各菌株产粗毒素水平与对樟巢螟致病力的相关性

各菌株产菌丝和粗毒素水平如图 1,Ma1291-2 和 Ma1775 产菌丝量极显著高于其他 3 株菌株,且 Ma1291-2 菌株产毒素水平极显著高于其他菌株。分析各菌株产粗毒素水平与其对樟巢螟幼虫校正死亡率和 LT_{50}的相关性,其线性回归方程分别为:$y_1 = 0.588504 + 1.823400x_1$, $R = 0.9452$; $y_2 = 0.614734 - 0.050792x_2$, $R = 0.9312$。结果说明菌株的产粗毒素水平与其对幼虫的致病力大小相关性较强。

2.3 绿僵菌 Ma1291-2 菌株粗毒素对樟巢螟幼虫的致病力

以不同浓度的粗毒素浸叶喂食幼虫,第 9 天全部死亡,其累计死亡率如图 2 所示,以高浓度 2 000 mg/L 处理,4 d 后死亡率达 50% 以上。低浓度 100 mg/L 对幼虫也有致毒效果,但在试验过程中发现,低浓度处理的部份幼虫触其不动或侧翻后,置于其他培养皿中,第 2 天有复活现象。

2.4 绿僵菌 Ma1291-2 菌株及其粗毒素对樟巢螟幼虫的时间-剂量-死亡率模型

建立 Ma1291-2 孢子悬液及其粗毒素对樟巢螟幼虫致病力的时间-剂量-死亡率模型,参数估计值见表 3。经 Hosmer-Lemeshow 拟合度检验,因 Ma1291-2: $x^2 = 46.48333$, $x^2 < \chi^2_{0.05}(35) = 53.203$, $P = 0.11324 > 0.05$;粗毒素: $x^2 = 32.61480$, $x^2 < \chi^2_{0.05}(63) = 82.52900$, $P = 0.99962 > 0.05$,即可认为

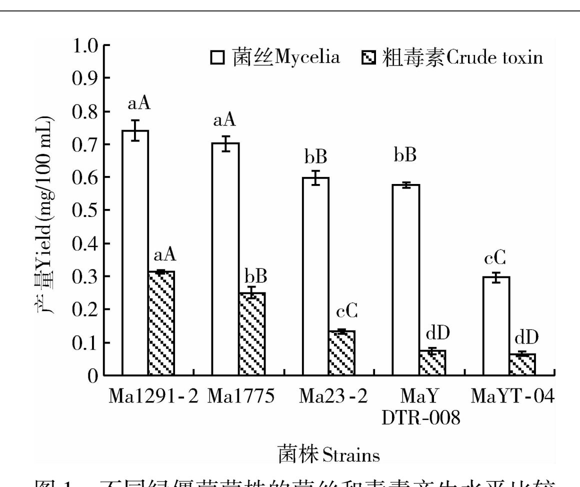


图 1 不同绿僵菌菌株的菌丝和毒素产生水平比较

Fig. 1 Levels of mycelia and toxin yielded by different *Metarhizium anisopliae* strains

柱上不同大小写字母分别表示不同菌株之间 Duncan 氏新复极差显著性检验 $P<0.01$ 和 $P<0.05$ 水平。Different capital and small letters above bars mean significant difference between strains by Duncan's new multiple range method tested at $P<0.01$ and $P<0.05$ levels, respectively.

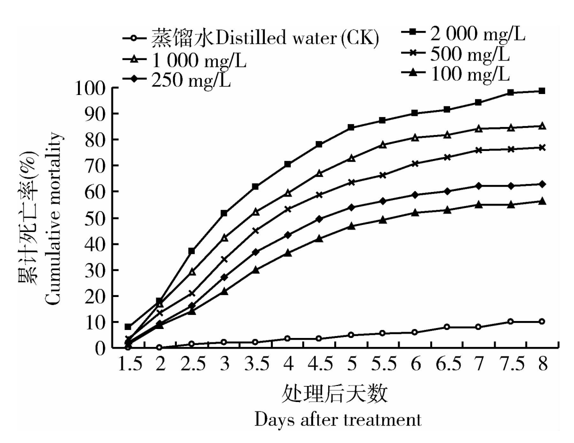


图 2 Ma1291-2 菌株粗毒素处理后樟巢螟幼虫的累计死亡率动态

Fig. 2 The cumulative mortality of *Orthaga achatina* larvae after treatment with the crude toxin of Ma1291-2 strain

模型拟合中不存在显著异质性,拟合成功。孢子悬液和粗毒素的剂量效应参数 β 分别为 0.4556 和 0.8765,表明该菌株各浓度的孢子悬液及其粗毒素对幼虫均有一定的致死效果。孢子悬液接菌处理的

表 3 绿僵菌 Ma1291-2 菌株及其粗毒素对樟巢螟幼虫的时间-剂量-死亡率模型和参数估计(条件死亡率)

Table 3 The time-dose-mortality modeling and parameter estimation (conditional mortality) of Ma1291-2 strain and its crude toxin against *Orthaga achatina* larvae

孢子悬液 Spore suspension				粗毒素 Crude toxin			
参数 Parameter	估计值 Estimated value	标准误 *SE*	*t* 测验 *t*-test	参数 Parameter	估计值 Estimated value	标准误 *SE*	*t* 测验 *t*-test
β	0.4556	0.0072	63.5280	β	0.8765	0.1239	7.0732
γ_3	−5.9926	0.7397	1.0913	$\gamma_{1.5}$	−5.7656	0.4300	13.4073
γ_4	−5.3223	0.8388	0.7714	γ_2	−4.6545	0.3767	12.3557
γ_5	−4.7290	0.8966	0.6001	$\gamma_{2.5}$	−4.4774	0.3786	11.8262
γ_6	−4.3956	0.8997	0.5538	γ_3	−4.2873	0.3717	11.5339
γ_7	−4.3891	0.8419	0.6316	$\gamma_{3.5}$	−4.3289	0.3741	11.5706
γ_8	−4.9781	0.6634	1.0807	γ_4	−4.4760	0.3862	11.5898
γ_9	−4.9631	0.6181	1.1957	$\gamma_{4.5}$	−4.3334	0.3816	11.3560
				γ_5	−4.6981	0.4083	11.5052
				$\gamma_{5.5}$	−5.0807	0.4434	11.4586
				γ_6	−4.8821	0.424	11.5152
				$\gamma_{6.5}$	−5.4877	0.4987	11.0045
				γ_7	−5.0635	0.4532	11.1715
				$\gamma_{7.5}$	−7.7000	1.3493	5.7067
				γ_8	−5.8366	0.5770	10.1162
				$\gamma_{8.5}$	−5.2315	0.4869	10.7438
				γ_9	−6.5913	0.8435	7.8147

时间效应参数 γ_i,在接菌后 5 d 内呈递增趋势,说明在此期间的死亡虫数每天都在增加,而接菌后 6 – 7 d,其 γ_i 较前后都相对较大,间接表明该幼虫在接菌后 6 – 7 d 死亡数量较多。可见,绿僵菌 Ma1291-2 孢子悬液对幼虫的致死效应在接菌后 6 – 7 d 较强,而该菌株粗毒素对幼虫致死效应较强的时间段为处理后的 3 – 4.5 d。

2.5 樟巢螟幼虫血淋巴细胞对 Ma1291-2 菌株粗毒素的免疫反应

2.5.1 总血淋巴细胞浓度的动态变化:取食浸有粗毒素嫩叶后,樟巢螟幼虫总血细胞浓度动态变化如图 3(A)所示。从图可知,取食 1 d 后幼虫总血细胞浓度显著升高,2 d 后达到最高值 93.71 × 10^3 个/μL,为对照的1.20倍,而后开始下降,6 d后达最小值

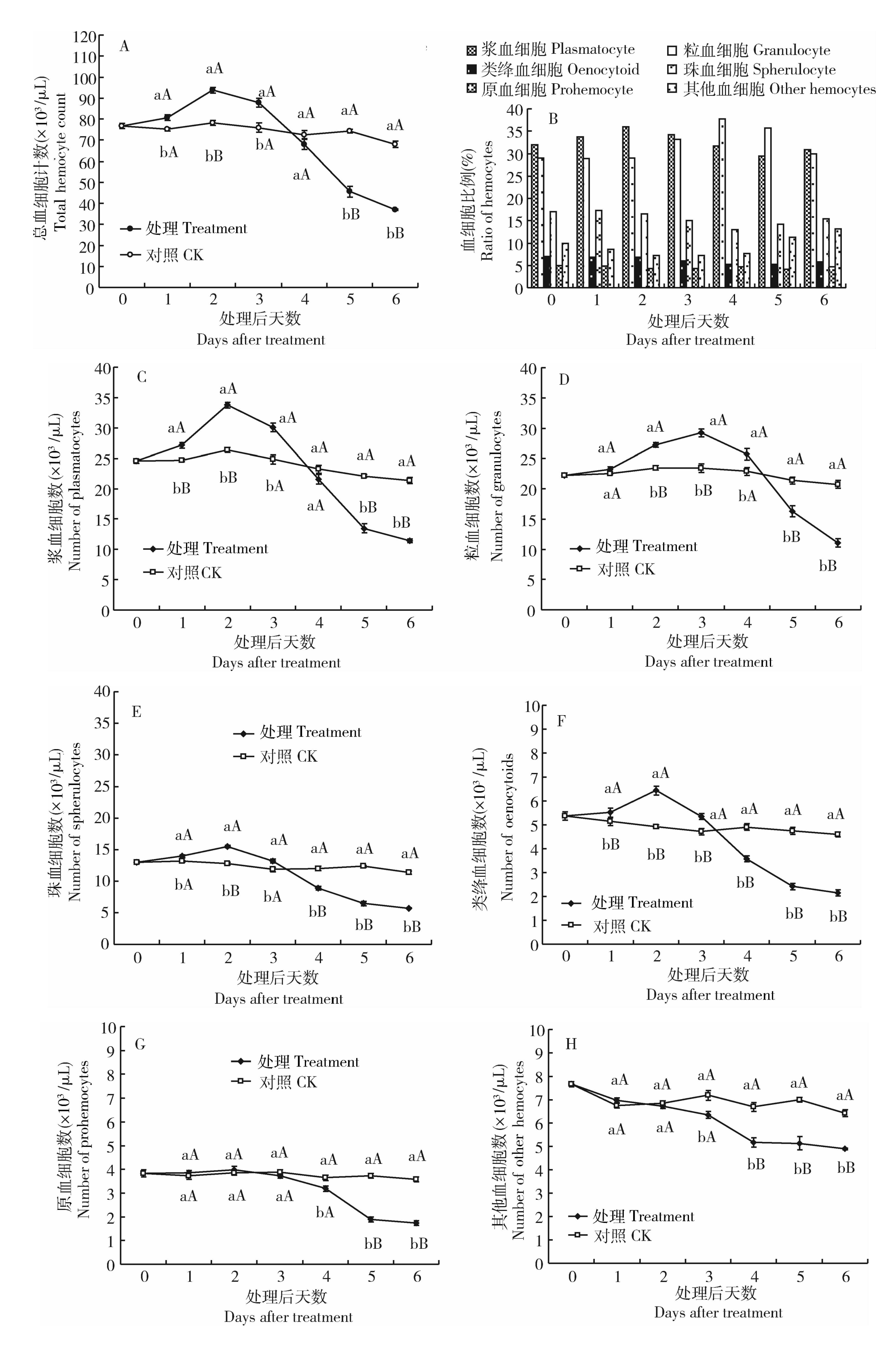


图 3　樟巢螟幼虫取食 Ma1291-2 菌株粗毒素后血细胞浓度动态变化

Fig. 3　Variation in hemocyte concentrations in *Orthaga achatina* larvae fed with crude toxin of Ma1291-2 strain

以蒸馏水中浸泡等时间的嫩叶喂食幼虫作对照(CK)。The control groups (CK) are the test larvae fed with leaves dealt with distilled water for equal time. A：总细胞计数 Total hemocyte count；B：各类血细胞比例 Ratio of various hemocytes；C：浆血细胞 Plasmatocyte；D：粒血细胞 Granulocyte；E：珠血细胞 Spherulocyte；F：类绛血细胞 Oenocytoid；G：原血细胞 Prohemocyte；H：其他血细胞 Other hemocytes.

36.99×10^3 个/μL,低至对照的 1.84 倍。可见,幼虫取食粗毒素后 1 d 后,其血淋巴细胞有显著反应,2 d 后最强烈。

2.5.2 各类血淋巴细胞浓度变化:幼虫各类血细胞浓度动态变化情况如图 3(B)所示,幼虫取食浸有粗毒素嫩叶后 1 - 3 d,血淋巴细胞中浆血细胞、珠血细胞和类绛血细胞浓度显著升高后急速下降,2 d 后达到最高值;粒血细胞 1 d 后与对照无显著差异,2 d 后极显著上升,3 d 后达到最高值后急速下降;而原血细胞前 3 d 未发现有数量变动现象,4 d 后显著下降;其他类型血细胞 3 d 后开始显著下降。在整个取食过程中,浆血细胞和粒血细胞占总血细胞数量比例较高,而原血细胞和类绛血细胞比例较少。

2.5.3 各类血细胞的形态变化:显微观察发现幼虫取食粗毒素后,各类血细胞的形态均有发生不同程度的病态变化(图 4)。(1)浆血细胞:正常的浆血细胞呈梭形、圆形,大小差别较大(图 4: A,B)。取食 3 d 后,浆血细胞有的肿胀,有的破裂现象,且有的具刺状或短芒状伪足(图 4: C)。(2)粒血细胞:正常的粒血细胞呈圆形,大小较均一,细胞膜规则平滑,细胞核位于细胞中央(图 4: D)。取食 4 d 后,有破裂,细胞内物质外溢现象(图 4: E)。(3)珠血细胞:珠血细胞呈花瓣状(图 4: F)。取食 3 d 后,细胞有所膨大,花瓣状呈不规则,珠形内含物变小,并



图 4 取食 Ma1291-2 菌株粗毒素后樟巢螟幼虫血细胞及其形态变化

Fig. 4 Hemocytes and their morphological changes in *Orthaga achatina* larvae fed with crude toxin of Ma1291-2 strain

A: 正常梭形浆血细胞 Normal fusiform plasmatocyte; B: 正常圆形浆血细胞 Normal spherical plasmatocyte; C: 病态浆血细胞 Morbid plasmatocyte; D: 正常粒血细胞 Normal granulocyte; E: 病态粒血细胞 Morbid granulocyte; F: 正常类绛血细胞 Normal oenocytoid; G: 病态类绛血细胞 Morbid oenocytoid; H: 正常珠血细胞 Normal spherulocyte; I: 病态珠血细胞 Morbid spherulocyte; J: 原血细胞 Prohemocyte; K: 其他血细胞(凝血细胞) Other hemocytes (thrombocyte); L: 其他血细胞(未知) Other hemocytes (unknown). d: 直径 Diameter; l: 长度 Length.

伴有轻度黑化，后期黑化程度加重（图 4：G）。（4）类绛血细胞：正常的类绛血细胞大多呈圆形，细胞表面不规则，有的胞膜向外伸出多个伪足（图 4：H）。取食 3 d 后，出现黑化现象（图 4：I）。（5）原血细胞：原血细胞呈圆形，轮廓清晰，边缘完整，细胞核位于细胞中央，细胞质均一（图 4：J）。处理后的原血细胞形态变化不大。（6）其他血细胞：主要有凝血细胞（图 4：K），还包括其他染色效果不明显的血细胞等（图 4：L）。可见，取食绿僵菌粗对幼虫血细胞有毒害和破坏作用。

3　讨论

昆虫病原真菌是昆虫病原微生物中最大的类群之一，全世界已报道的约有 100 多个属 800 多种，可寄生 5 个目 100 多个属的 215 种昆虫，报道的新种达 24 种，占病死昆虫的近 60%（王记祥和马良进，2009），是害虫生物控制的潜力生物资源，而其毒素被认为是昆虫病原真菌致死昆虫的一种有效手段（蒲蜇龙和李增智，1996）。应用 5 株绿僵菌对樟巢螟幼虫进行致病力测定，Ma1291-2 菌株对幼虫有较强的致病力，为该害虫的生物防治提供菌株资源，同时，本研究进一步证实了菌株产粗毒素水平与其对幼虫的校正死亡率和致死中时（LT_{50}）呈显著相关，且粗毒素对幼虫致死效应较强的时间早于孢子悬液处理，这与绿僵菌侵染需较长的过程有关。

樟巢螟幼虫取食绿僵菌粗毒素后，除了原血细胞浓度前 3 d 未发生明显变化，总血细胞和其他各类血细胞浓度均呈不同程度的先升高后下降变化。血淋巴细胞免疫是昆虫天然免疫的重要功能之一，存在于昆虫血浆或血细胞表面的不同模式识别蛋白（pattern recognition proteins, PRPs），能够识别异己成分并启动免疫反应（Hoffman, 2003；宁媛媛等，2009）。不同的 PRPs 与病原相关分子模式（pathogen-associated molecular pattern, PAMP）的结合继而引发一系列的免疫反应，包括细胞吞噬、包裹、凝聚、抗菌肽的形成以及酚氧化酶原级联反应等（Lazzaro, 2008）。一般认为不同的诱导源如生物、物理、化学因子，均可诱导昆虫产生非专一性的天然免疫反应（宁媛媛等，2009）。绿僵菌素种类繁多，有酶类高分子蛋白毒素和环缩肽类、色素类、有机酸类等低分子毒素，以及一些非酶类糖蛋白等大分子毒素。樟巢螟幼虫绿僵菌粗毒素后，粗毒素大多以分子等物质形式进入血淋巴，诱导和激活昆虫体内免疫反应；浆血细胞、粒血细胞等是主要免疫细胞（莫非等，2001），幼虫取食绿僵菌粗毒素后 2 – 3 d，其浓度急速上升，但是随着体液免疫系统受到毒素的干扰和抑制，虫体中毒，细胞崩解及活性下降等原因，其血细胞浓度迅速下降。而原血细胞是非免疫细胞，且其细胞增殖可能受到毒素抑制，前期浓度没有明显变化，但后期随着幼虫机体衰弱而降低，傅贻玲（1982）和莫非等（2001）认为各类血细胞极有可能都是由原血胞分化而来，这也可能是各类主要免疫细胞浓度迅速下降的重要原因之一。前人研究也发现，绿僵菌素能扰乱昆虫分泌系统的正常功能，抑制细胞的增殖、破坏细胞结构、诱导细胞凋亡、抑制血细胞的运动，降低血淋巴免疫系统（Vey and Quiot, 1989；Vilcinskas *et al*., 1997a, 1997b；Vey *et al*., 2002；孟翔等，2011）。研究中发现，取食绿僵菌粗毒素 3 d 后，樟巢螟幼虫的浆血细胞、粒血细胞有破裂，珠血细胞和类绛血细胞有黑化现象，Vey 等（2002）用绿僵菌素 E 处理大蜡螟幼虫后，其粒细胞、浆细胞和绛色细胞有出现胞核固缩或损坏，胞浆有一定程度的空化，表明取食绿僵菌粗毒素对幼虫血细胞也有毒害和破坏作用。但是，幼虫取食粗毒素后，粗毒素以哪些物质形态进入幼虫血腔，哪些物质对幼虫血淋巴免疫系统起主要抑制和毒害作用还有待进一步研究。

本研究过程中，选择了绿僵菌粗毒素的较高剂量（2 000 和 1 000 mg/L 等）5 种浓度梯度进行试验，主要因为：（1）芳香樟叶片，表面具蜡质，浸叶处理叶面不易吸附溶液，选择高浓度处理以提高粗毒素的沾附量，亦有待进一步筛选表面活性物质等助剂，提高其沾附力；（2）在预试验过程中发现，绿僵菌粗毒素低剂量处理，幼虫有强直或昏迷不动而第 2 天复活现象，易误判为死亡而产生试验误差；早期的研究表明，注射绿僵菌素 A 或 B，低剂量也会造成试虫的强直等现象（蒲蜇龙和李增智，1996）。因此本研究选择高剂量处理，对低剂量处理复苏后的幼虫，以及时放回原处理的玻璃瓶内继续饲养观察其存活情况解决。另外，幼虫取食粗毒素后，随着血细胞逐渐受到破坏或黑化，在各类型血细胞计数时，本研究对被严重破坏或黑化等无法辨别的血细胞未计其内。

绿僵菌 Ma1291-2 菌株对樟巢螟幼虫有较强的致病力，在该害虫生物防治中可以应用，且其粗毒素喂食能使幼虫血细胞发生较大的浓度和生理病变，也有较大的应用潜能。但目前对绿僵菌素研究主要

还是集中在室内试验,并以昆虫体腔注射为主,田间应用的实例尚未见报道,主要原因是:(1)病原真菌毒素产量较低,提取工艺较复杂,防治成本较高;(2)野外使用受环境条件影响,真菌毒素活性下降;(3)绿僵菌素种类繁多,功能各异,人工合成困难较大。其高分子毒素主要作用于真菌入侵过程,而低分子毒素有助于真菌击败昆虫的免疫防御系统而成功感染昆虫(Vilcinskas *et al*., 1997b),造成体内马氏管和中肠等的正常功能失调(Gillespie and Claydon, 1989; Vey and Quiot, 1989; Vey *et al*., 1993)。因此,为了挖掘绿僵菌毒素的应用潜力,有待进一步利用分子生物学等手段,寻找和探索高产毒素水平改良方法,深入研究生态环境因子与毒素活性的关系,明确绿僵菌素各成份对昆虫的致毒机理,为真菌毒素的开发应用奠定基础。

致谢 感谢福建农林大学应用生态研究所、加拿大布鲁克大学 Vasseur Liette 教授对文中英文部分的修正。

参考文献(References)

Brousseau C, Charpentier G, Belloncik S, 1996. Susceptibility of spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* Clemens, to destruxins, cyclodepsipeptidic mycotoxins of *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 68(2): 180 – 182.

Cheng JQ, 1987. The methods of observation and counting of insect hemocytes. *Entomological Knowledge*, 24(5): 297 – 299. [程惊秋, 1987. 昆虫血细胞的观察和计数方法. 昆虫知识, 24(5): 297 – 299]

Claydon N, Grove JF, 1982. Insecticidal secondary metabolic products from the entomogenous fungus *Verticillium lecanii*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 40: 413 – 418.

Feng MG, 1998. Substituting time-dose-mortality model for probit analysis technique. *Entomological Knowledge*, 35(4): 233 – 237. [冯明光, 1998. 时间-剂量-死亡率模型取代机率分析技术. 昆虫知识, 35(4): 233 – 237]

Fu YL, 1982. Insect hemocytes (I). *Entomological Knowledge*, 19(3): 45 – 47. [傅贻玲, 1982. 昆虫的血细胞(一). 昆虫知识, 19(3): 45 – 47]

Gillespie AT, Claydon N, 1989. The use of entomogenous fungi for pest control and the role of toxins in pathogenesis. *Pest Science*, 27: 203 – 215.

He XY, 2007. Screening for Virulent Strains of *Metarhizium anisopliae* against *Monochamus alternatus* and Their Survival Dynamics in Forest. PhD Dissertation, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou. 45 – 52. [何学友, 2007. 金龟子绿僵菌松墨天牛优良菌株筛选及其林间宿存研究. 福州: 福建农林大学博士学位论文. 45 – 52]

Hoffman JA , 2003. The immune response of *Drosophila*. *Nature*, 426 (6962): 33 – 38.

Hu QB, Ren SX, 2004. Review of destruxins of *Metarhizium anisopliae* Sorokin. *Chinese Journal of Biological Control*, 20(4): 234 – 242. [胡琼波, 任顺祥, 2004. 绿僵菌素的研究进展. 中国生物防治, 20(4): 234 – 242]

Hu QB, Ren SX, Liu SY, 2007. Purification of destruxins produced by *Metarhizium anisopliae* and bioassay of their insecticidal activities against grubs. *Acta Entomologica Sinica*, 50(5): 461 – 466. [胡琼波, 任顺祥, 刘树艳, 2007. 绿僵菌素的分离制备及其对蛴螬的毒力. 昆虫学报, 50(5): 461 – 466]

Kershaw MJ, Moorhouse ER, Bateman R, Reynolds SE, Charnley AK, 1999. The role of destruxins in the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* for three species of insect. *Journal of Invertebrate Pathology*, 74: 213 – 223.

Lazzaro BP, 2008. Natural selection on the *Drosophila* antimicrobial immune system. *Current Opinion in Microbiology*, 11(3): 284 – 289.

Lv LH, He YR, Wu YJ, Feng X, Chen HY, 2007. The time-dose-mortmity model of a *Paecilomyces fumosoroseus* isolate on the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Acta Entomologica Sinica*, 50(6): 567 – 573. [吕利华, 何余容, 武亚敬, 冯夏, 陈焕瑜, 2007. 玫烟色拟青霉对小菜蛾致病力的时间-剂量-死亡率模型模拟. 昆虫学报, 50(6): 567 – 573]

Meng X, Hu JJ, Jin FL, Ren SX, 2011. Inhibition of cellular proliferation and apoptosis in *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) SL-1 cells induced by destruxin A and destruxin B. *Acta Entomologica Sinica*, 54(9): 1003 – 1009. [孟翔, 胡俊杰, 金丰良, 任顺祥, 2011. 绿僵菌素 A 和 B 对斜纹夜蛾 SL-1 细胞的增殖抑制和致凋亡作用. 昆虫学报, 54(9): 1003 – 1009]

Mo F, Bao HE, Luo FT, 2001. Analysis of hemocytes in the larvae of *Culex pipien quinquefasciatus*. *Journal of Guiyang Medical College*, 26(4): 293 – 286. [莫非, 包怀恩, 罗福田, 2001. 致倦库蚊幼虫期血淋巴细胞的观察. 贵阳医学院学报, 26(4): 293 – 286]

Ning YY, You MS, Wang CS, 2009. Advances in the mechanisms of insect immune recognition and pathogen immune escape. *Acta Entomologica Sinica*, 52(5): 567 – 575. [宁媛媛, 尤民生, 王成树, 2009. 昆虫免疫识别与病原物免疫逃避机理研究进展. 昆虫学报, 52(5): 567 – 575]

Pu ZL, Li ZZ, 1996. Insects Mycology. Anhui Science and Technology Publishing House, Hefei. [蒲蛰龙, 李增智, 1996. 昆虫真菌学. 合肥: 安徽科学技术出版社]

Qiu JZ, Song FF, Mao LH, Tu J, Guan X, 2013. Time-dose-mortality data and modeling for the entomopathogenic fungus *Aschersonia placenta* against the whitefly *Bemisia tabaci*. *Canadian Journal of Microbiology*, 59(2): 97 – 101.

Su YB, Guo QF, Tu J, Li XX, Meng LX, Cao LP, Dong D, Qiu JZ, Guan X, 2013. Proteins differentially expressed in conidia and mycelia of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* sensu stricto. *Canadian Journal of Microbiology*, 59(7): 443 – 448.

Tang QY, Feng MG, 2002. DPS Data Processing System for Practical Statistics. Science Press, Beijing. [唐启义, 冯明光, 2002. 实用统计分析及其 DPS 数据处理系统. 北京: 科学出版社]

Tian JC, Ye GY, 2006. Several method for identification, separation and purification of hemocytes in Lepidoptera. *Natural Enemies of Insects*, 28(4): 174 – 179.［田俊策，叶恭银，2006. 鳞翅目昆虫血细胞鉴定与分离纯化的几种方法. 昆虫天敌，28(4): 174 – 179］

Tong YH, 2012. A study of the virulence of *Beauveria bassiana* strains against *Bipectilus zhejiangensis* Wang larvae. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*, 34(5): 922 – 927.［童应华，2012. 球孢白僵菌对浙江双栉蝠蛾幼虫的致病力研究. 江西农业大学学报，34(5): 922 – 927］

Vey A, Matha V, Dumas C, 2002. Effects of the peptide mycotoxin destruxin E on insect haemocytes and on dynamics and efficiency of the multicellular immune reaction. *Journal of Invertebrate Pathology*, 80(3): 177 – 187.

Vey A, Quiot JM, 1989. Effect cytotoxique in *vitro* et chez l′insecte hôte des destruxines, toxines cyclodepsipeptidiques produites par le champignon entomopathogene *Metarhizium anisopliae*. *Canadian Journal of Microbiology*, 35(11): 1000 – 1008.

Vey A, Quiot JM, Mazet I, McCoy CW, 1993. Toxicity and pathology of crude broth filtrate produced by *Hirsutella thompsonii* var. *thompsonii* in shake culture. *Journal of Invertebrate Pathology*, 61(2): 131 – 137.

Vilcinskas A, Matha V, Götz P, 1997a. Effects of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and its secondary metabolites on morphology and cytoskeleton of plasmatocytes isolated from the greater wax moth, *Galleria mellonella*. *Journal of Insect Physiology*, 43(12): 1149 – 1159.

Vilcinskas A, Matha V, Götz P, 1997b. Inhibition of phagocytic activity of plasmatocytes isolated from *Galleria mellonella* by entomogenous fungi and their secondary metabolites. *Journal of Insect Physiology*, 43(5): 475 – 483.

Wang JH, 2007. Studies on the Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* Isolate MA3 to *Brontispa longissima* (Gestro). PhD Dissertation, South China University of Tropical Agriculture, Guangzhou. 45 – 51.［王九辉，2007. 绿僵菌 MA3 对椰心叶甲的致病性研究. 广州：华南热带农业大学博士学位论文. 45 – 51］

Wang JX, Ma LJ, 2009. Application of entomogenous fungi in biological control of agriculture and forestry pests. *Journal of Zhejiang Forestry College*, 26(2): 286 – 291.［王记祥，马良进，2009. 虫生真菌在农林害虫生物防治中的应用. 浙江林学院学报，26(2): 286 – 291］

Wang Q, Cui ZF, Wang YL, Shen XY, Zhang XM, 2011. Comparison among three staining methods to hemocytes of *Oxya chinensis*. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 48(4): 841 – 844.［王强，崔智芳，王云丽，申旭燕，张小民，2011. 中华稻蝗血细胞染色方法的比较. 应用昆虫学报，48(4): 841 – 844］

Wang SG, Ye GY, Hu C, 2006. The impacts of transgenic *cry1Ab* rice on the hemocytes of *Chilo suppressalis* larvae. *Acta Entomologica Sinica*, 49(2): 200 – 205.［王世贵，叶恭银，胡萃，2006. 转 *cry1Ab* 基因水稻对二化螟幼虫血细胞的影响. 昆虫学报，49(2): 200 – 205］

Wu XF, Huang S, Zhu GH, Wang H, 2006. Research on the integrated control of the *Orthaga achatina* Butier. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 34(10): 2198 – 2199, 2223.［吴雪芬，黄顺，朱广慧，王晖，2006. 樟巢螟综合防治研究. 安徽农业科学，34(10): 2198 – 2199, 2223］

Xu HC, Shi ZH, Wu H, 2006. Virulence of *Beauveria bassiana* against *Takecallis taiwanus* (Takahashi). *Scientia Silvae Sinicae*, 42(1): 85 – 89.［徐华潮，施祖华，吴鸿，2006. 球孢白僵菌对竹梢凸唇斑蚜的毒力. 林业科学，42(1): 85 – 89］

Yin F, Hu QB, Zhong GH, Hu MY, 2010. Effects of destruxins on entomopathogenic fungus *Isaria javanicus* and the joint toxicity of their mixtures against the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae). *Acta Entomologica Sinica*, 53(1): 61 – 67.［尹飞，胡琼波，钟国华，胡美英，2010. 绿僵菌素对爪哇棒孢霉 SP053 菌株的影响及其混用对小菜蛾的联合毒力. 昆虫学报，53(1): 61 – 67］

（责任编辑：赵利辉）